

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-32696

(43)公開日 平成5年(1993)2月9日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 7/10	Z N A	8318-4H		
// A 6 1 K 37/24	A B J			
	A B U			
	A D F			
	A D T			

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-227232	(71)出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町4丁目1番1号
(22)出願日	平成3年(1991)9月6日	(72)発明者	中河 静枝 大阪府大阪市住之江区南港中5丁目6番23-709号
(31)優先権主張番号	特願平2-257490	(72)発明者	福田 常彦 京都府京都市西京区大原野西境谷町2丁目9番10-202号
(32)優先日	平2(1990)9月28日	(72)発明者	川瀬 雅弘 兵庫県川西市笹部大道ノ西28番地の108
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(72)発明者	山崎 巖 兵庫県宝塚市雲雀丘山手1丁目9番21号
		(74)代理人	弁理士 太多和 明敏 (外1名)

(54)【発明の名称】 副甲状腺ホルモン誘導体

(57)【要約】 (修正有)

【構成】ヒト副甲状腺ホルモンPTH(1-34)の1、8、11、12、13、18、19、21、23、25、26、27または34位の1以上を他のアミノ酸で置換した一般式〔I〕のペプチドまたはその塩。

$R_1$ -Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu- $R_2$ -His-Asn- $R_3$ - $R_4$ - $R_5$ -His-Leu-Asn-Ser- $R_6$ - $R_7$ -Arg- $R_8$ -Glu- $R_9$ -Leu- $R_{10}$ - $R_{11}$ - $R_{12}$ -Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn- $R_{13}$ 〔I〕

〔 $R_1$ はSerまたはAib、 $R_2$ はMetまたは天然型の脂溶性アミノ酸、 $R_3$ はLeu, Ser, Lysまたは芳香族アミノ酸、 $R_4$ はGlyまたはD-アミノ酸、 $R_5$ はLysまたはLeu、 $R_6$ はMetまたは天然型の脂溶性アミノ酸、 $R_7$ はGluまたは塩基性アミノ酸、 $R_8$ はValまたは塩基性アミノ酸、 $R_9$ はTrpまたは2-(1,3-ジチオラン-2-イル) Trp、 $R_{10}$ はArgまたはHis、 $R_{11}$ はLysまたはHis、 $R_{12}$ はLys, GlnまたはLeu、 $R_{13}$ はPheまたはPhe-NH<sub>2</sub>を示す〔ただし同時に $R_1$ がSer、 $R_2$ がMet、 $R_3$ がLeu、 $R_4$ がGly、D-AlaまたはD-Pro、 $R_5$ がLys、 $R_6$ がMet、 $R_7$ がGlu、 $R_8$ がVal、 $R_9$ がTrp、 $R_{10}$ がArg、 $R_{11}$ がLys、 $R_{12}$ がLysである場合を除く〕

【効果】種々の蛋白質分解酵素への抵抗性が増し血中で

の活性持続性が上昇するなど優れたPTH誘導体を得て、骨疾患等の有用な医薬となる。

## 【特許請求の範囲】

$R_1$ -Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu- $R_2$ -His-Asn- $R_3$ - $R_4$ - $R_5$ -His-Leu-Asn-Ser- $R_6$ - $R_7$ -Arg- $R_8$ -Glu- $R_9$ -Leu- $R_{10}$ - $R_{11}$ - $R_{12}$ -Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn- $R_{13}$ 〔I〕

〔式中 $R_1$ はSerまたはAibを、 $R_2$ はMetまたは天然型の脂溶性アミノ酸を、 $R_3$ はLeu, Ser, Lysまたは芳香族アミノ酸を、 $R_4$ はGly, またはD-アミノ酸を、 $R_5$ はLysまたはLeuを、 $R_6$ はMetまたは天然型の脂溶性アミノ酸を、 $R_7$ はGlu, または塩基性アミノ酸を、 $R_8$ はVal, または塩基性アミノ酸を、 $R_9$ はTrpまたは2-(1,3-ジチオラン-2-イル) Trpを、 $R_{10}$ はArgまたはHisを、 $R_{11}$ はLysまたはHisを、 $R_{12}$ はLys, GlnまたはLeuを、 $R_{13}$ はPheまたはPhe-NH<sub>2</sub>を示す。〔ただし、同時に、 $R_1$ がSer、 $R_2$ がMet、 $R_3$ がLeu、 $R_4$ がGly、D-AlaまたはD-Pro、 $R_5$ がLys、 $R_6$ がMet、 $R_7$ がGlu、 $R_8$ がVal、 $R_9$ がTrp、 $R_{10}$ がArg、 $R_{11}$ がLys、 $R_{12}$ がLysである場合を除く〕で表されるペプチドまたはその塩。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17  
H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-  
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34  
Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH  
(配列番号：1)

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】PTHの生物学的作用からして、これを医薬として用いれば種々の骨疾患等に対する有用な医薬品となり得る事が期待されるが、ペプチドが有する次の様な性質がそれを困難にしている。

1. 体内で種々の酵素により分解を受け易い。2. 種々の経路における体内への吸収効率が非常に低い。3. 例えば酸化等、種々の物理化学的条件に対し、不安定である。この様な問題点を解決すべく、又当該ホルモンの構造活性相関を理解すべくPTH(1-34)フラグメントについて種々の誘導体の合成がなされてきたが、それらは主にウシPTH(1-34)に関するものであり、ヒトPTH(1-34)に関してはその例は少ない。例えばヒトPTH(1-34)のC末端PheをPhe-NH<sub>2</sub>に変換すると活性の上昇が見られる(特開昭58-96052)事が知られている。しかし、これはカルボキシルペプチダーゼによる分解が抑えられ、その結果見かけの活性上昇が観察されたものと思われる。また、ヒトPTH(1-34)にはMetが2残基含まれるが、これらをNleに置換した分子では酸化によるホルモン活性消失が防止されることが知られている

$R_1$ -Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu- $R_2$ -His-Asn- $R_3$ - $R_4$ - $R_5$ -His-Leu-Asn-Ser- $R_6$ - $R_7$ -Arg- $R_8$ -Glu- $R_9$ -Leu- $R_{10}$ - $R_{11}$ - $R_{12}$ -Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn- $R_{13}$ 〔I〕

〔式中 $R_1$ はSerまたはAibを、 $R_2$ はMetまたは天然型の脂溶性アミノ酸を、 $R_3$ はLeu, Ser, Lysまたは芳香族アミノ酸を、 $R_4$ はGly, またはD-アミノ酸を、 $R_5$ はLysまたは

## 【請求項1】

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明はホルモンによる治療剤として有用な、新規副甲状腺ホルモンペプチド誘導体に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】副甲状腺ホルモン(PTH)は副甲状腺で合成された後、その標的器官である骨、腎臓、腸に作用して、主に血中カルシウムやリン酸イオンの濃度を調節する重要な働きをしている。PTHは84個のアミノ酸からなるペプチドホルモンであるがその生物学的作用はN末端(1-34位)のペプチドフラグメントで再現できる事が知られている〔G.W.Tregearら、エンドクリノロジー(Endocrinology), 93 1349-1353 (1973)〕。このヒト型PTHのN末端(1-34位)のペプチドフラグメント(ヒトPTH(1-34)と略す)のアミノ酸配列は以下の通りである。

(特開昭61-24598)。しかしNleは非天然型アミノ酸であり、医薬としての用途を考えた場合より好ましいアミノ酸置換が望まれる。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者はこのような課題を解決するために、ヒトPTH(1-34)におけるアミノ酸の置換を化学合成的に実施し、ヒトPTH(1-34)に種々の蛋白質分解酵素に対する抵抗性を考慮したアミノ酸置換をほどこす事により、また予想される2次元構造や、親水・疎水性もしくはイオンの環境を考慮したアミノ酸置換を試みる事により、当該ホルモンのレセプターへの親和性を高め、さらには酸、アルカリ性条件、酸化条件等に対して不安定なアミノ酸を、活性を低下させる事なく、これらの条件に対して安定なアミノ酸に置換することによってこの目的が達成されることを見出し、本発明を完成したものである。これにより効果的に臨床応用可能なPTH類似体を提供することに成功したものである。

## 【0005】すなわち本発明は、

Leuを、 $R_6$ はMetまたは天然型の脂溶性アミノ酸を、 $R_7$ はGlu, または塩基性アミノ酸を、 $R_8$ はVal, または塩基性アミノ酸を、 $R_9$ はTrpまたは2-(1,3-ジチオラン-2-イ

ル) Trpを、 $R_{10}$ はArgまたはHisを、 $R_{11}$ はLysまたはHisを、 $R_{12}$ はLys、GlnまたはLeuを、 $R_{13}$ はPheまたはPhe-NH<sub>2</sub>を示すが、同時に $R_1$ がSer、 $R_2$ がMet、 $R_3$ がLeu、 $R_4$ がGly、D-AlaまたはD-Pro、 $R_5$ がLys、 $R_6$ がMet、 $R_7$ がGlu、 $R_8$ がVal、 $R_9$ がTrp、 $R_{10}$ がArg、 $R_{11}$ がLys、 $R_{12}$ がLysである場合を除く〕(配列番号：2)で表されるペプチドまたはその塩に関するものである。

【0006】 $R_2$ 、 $R_6$ における天然型の脂溶性アミノ酸としては天然(動物、植物または微生物)のタンパク質を構成するアミノ酸のうち脂溶性のものをいい、具体的には、Leu、Ile、Val、PheおよびTrp等が挙げられる。 $R_3$ における芳香族アミノ酸としてはPhe、 $\beta$ -ナフチルAla、TrpおよびTyr等が挙げられる。 $R_4$ におけるD-アミノ酸としてはD- $\alpha$ -アミノ酸であれば、特に限定されるものではなく、具体的にはD-Leu、D-Ile、D-Nle、D-Val、D-Ser、D-Ser(But)、D-Abu、D-Thr、D-Nva、D-Met、 $\beta$ -ナフチル-D-Ala、D-Trp、D-Tyr、D-Lys、D-Lys(Fmoc)、D-Phe、D-Asnなどが挙げられるが、一般に中性アミノ酸が好ましく、例えばD-Ser、D-Leu、D-ナフチルAla、D-Trp、D-Asn、D-Tyr等が挙げられる。 $R_7$ 、 $R_8$ における塩基性アミノ酸としてはArg、Lys、Asn、His等が挙げられる。これらの置換は一ヶ所だけでなく、何ヶ所かの置換の組合せも可能であり、後述の実施例にあるように特に3ヶ所までの置換の組合せは実用的である。

【0007】本発明におけるペプチド合成はペプチド自動合成装置によって行うことができる。基本的な合成過程等はR.B.Merrifield〔アドバンシズ イン エンザイモロジー (Advances in Enzymology) 32, 221-296(1969)〕の方法に順じている。この方法は、カルボキシル末端のアミノ酸を樹脂担体に共有結合させておき、 $\alpha$ -アミノ基の保護基の除去、保護アミノ酸の縮合を順次繰返して、アミノ末端に向けてペプチド鎖を延長させ目的のアミノ酸配列を有する保護ペプチド樹脂を得る事をその原理としている。各アミノ酸の縮合や $\alpha$ -アミノ基の保護基の除去などは、ほぼ同一の条件でなされ、中間体の精製も行なわない為、合成に際しては一般に高度な熟練は要求されない。しかもこの方法は迅速であり、種々のペプチドを合成するに際し、非常に便利な方法である。こうして得られた保護ペプチド樹脂を、例えば無水フッ化水素、トリフルオロメタンスルホン酸もしくはトリフルオロ酢酸と種々の添加物の共存下に反応させる事により、ペプチドの樹脂からの脱離と全保護基の除去を一段階で行うことができる。得られたペプチド粗精製物は、ペプチドまたは蛋白質を精製する公知の手段で精製することができる。例えばゲル濾過、陽イオン交換、もしくは陰イオン交換樹脂を用いるイオン交換クロマトグラフィー、さらには疎水クロマトグラフィー、分配吸着クロマトグラフィー等、種々の原理によるカラムクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーが挙げられる。本発明のペプチドは種々の塩の形で得られる。塩として

は、例えば無機酸や、ギ酸、酢酸、酒石酸、クエン酸などの有機酸との塩、もしくはナトリウムやアンモニアなどの無機塩基や、トリエチルアミン、エチルアミン、メチルアミン等の有機塩基との塩が挙げられる。

【0008】本発明の一般式(I)で表わされるヒトPTH(1-34)誘導体ペプチドは、骨粗鬆症治療剤、副甲状腺機能低下症の治療剤、高血圧治療剤として用いることができる。そしてその剤型としては、注射剤、経鼻吸収剤、直腸吸収剤、膣吸収剤、経皮吸収剤もしくは点眼剤のようなものが挙げられるが、場合により経口投与されることもある。該ペプチドをこのような治療剤として用いる場合、哺乳動物に対してその有効量が用いられる。一般的には1 ng~100  $\mu$ g/体重kgの範囲で用いられるが、この厳密な量については当業者によって適宜決められるものである。このペプチドを治療剤として用いる場合には、注意深く精製を行ない細菌や発熱物質が存在しないように注意しなければならない。このペプチドを骨粗鬆症などの治療薬として用いる場合、そのままあるいは薬理学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤と混合したのち、上記注射剤、経鼻吸収剤、直腸吸収剤、膣吸収剤、経皮吸収剤もしくは点眼剤などの剤型で非経口的に投与することができる。投与量は成人の場合、注射剤の場合、1回あたり50 ng~5 mg、好ましくは1~500  $\mu$ gで1~3日に1回の投与が適当である。治療剤の濃度は注射剤では10~100  $\mu$ g/mlが適当である。

【0009】本発明明細書において、アミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL-体を示すものとする。

GlyまたはG : グリシン  
AlaまたはA : アラニン  
ValまたはV : バリン  
LeuまたはL : ロイシン  
IleまたはI : イソロイシン  
SerまたはS : セリン  
ThrまたはT : スレオニン  
CysまたはC : システイン  
MetまたはM : メチオニン  
GluまたはE : グルタミン酸  
AspまたはD : アスパラギン酸  
LysまたはK : リジン  
ArgまたはR : アルギニン  
HisまたはH : ヒスチジン  
PheまたはF : フェニールアラニン  
TyrまたはY : チロシン  
TrpまたはW : トリプトファン  
ProまたはP : プロリン

AsnまたはN : アスパラギン  
 GlnまたはQ : グルタミン  
 Aib : アミノイソブチル酸  
 Nle : ノルロイシン  
 $\beta$ -Ala :  $\beta$ -アラニン  
 hPTH : ヒトPTH  
 Fmoc : 9-フルオレニルメトキシカルボニル  
 Nva : ノルバリン  
 Abu :  $\alpha$ -アミノブチル酸

#### 【0010】

【作用】PTH(1-34)に本発明のような置換を行なうことによって、種々の蛋白質分解酵素に対する抵抗性が増し、血中での活性の持続性が得られる。これは例えば第1位のAib、或いは第12位のD-アミノ酸への置換で達成された。この12位Gly付近は $\beta$ -ターン構造をもっていると思われるが、これのD-アミノ酸、中でもD-Leu、D-Trp、D-Valなどのかさ高いD-アミノ酸への置換は、この構造の安定化に寄与し、またこの部位での蛋白分解酵素によるペプチド鎖切断を阻止することにもなっていると考えられる。また8位、18位のMetのLeuなどの脂溶性天然アミノ酸への置換は、酸化に対する抵抗性を増し、活性の低下ないし消失を防ぐ上で有用である。さらに他の部位のアミノ酸残基の置換ではPTH誘導体のレセプターとの親和性が増し、高いPTH活性が発現されている。例えば11位は本来Leuであるが、芳香環側鎖を有するアミノ酸、例えばPheへの置換がより好ましいし、25、26、27位の塩基性アミノ酸部位の置換、特に27位のLysのGln、Leuへの置換により、また23位のTrpの2-(1,3-ジチオラン-2-イル) Trpへの置換により高いPTH活性が発現されている。またMetの他の天然型アミノ酸、例えばLeuやGlnへの置換は、活性を同等もしくはそれ以上に保持し、かつ酸化反応に対して抵抗性を有する誘導体を得る事を目的とするものである。ここに挙げた代表的なアミノ酸置換の例は本発明を制限するものと解釈されるべきではない。

#### 【0011】

##### 【実施例】

#### 【0012】

【実施例1】PTH部分ペプチド(1-34位)類縁体の合成と精製

本ペプチドの合成はメリフィールドらにより開発されたペプチドの固相合成法(R.B.Merrifield, アドバンシズ イン エンザイモロジー(Adv. Enzymol.)32巻、221-296頁1969年)の変法に順じて行われ、自動ペプチド合成機430A(アプライドバイオシステムズ社)を用いた。保護ペプチド-樹脂の合成はアプライドバイオシステムズ社指定のプロトコルを用いた。カルボキシル末端が遊離カルボン酸の誘導体を得る場合には保護アミノ酸-pオキシメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂(ポリスチレ

ン-1%ジビニルベンゼン)を、またカルボキシルアミドの誘導体を得る場合には4-メチルベンズヒドリル樹脂を出発原料とし、これに逐次保護アミノ酸を縮合させた。縮合時に各アミノ酸の $\alpha$ -アミノ基を保護するため、三級ブチルオキシカルボニル(BOC)基を用いた。側官能基保護は次のように行なった。セリンとスレオニンのヒドロキシル基はO-ベンジルエーテルとして、チロシンのヒドロキシル基又はp-ブロモベンジルオキシカルボニルエステルとして、グルタミン酸及びアスパラギン酸のカルボキシル基はベンジルエステルとして、ヒスチジンのイミダゾール窒素はベンジルオキシメチルによって、リジンの側鎖アミノ基は2-クロルベンジルオキシカルボニルで、アルギニンのグアニジン官能基はp-トルエンスルホン基で、トリプトファンのインドールイミンはホルミル基で保護した。すべてのアミノ酸は、アプライド・バイオシステムズジャパン社又はバッチェム・ケミカルズから入手した。

【0013】樹脂上に全てのアミノ酸を縮合した後、保護ペプチド樹脂を合成機から取り出し、乾燥した。ペプチド樹脂(1g)を、p-クレゾール(1ml)、1,2-エタンジチオール(1ml)、2-メルカプトピリジン(100mg)を含んだ、無水フッ化水素(8ml)と、0℃で2時間反応させた。反応終了後、フッ化水素を留去し、残留物をジエチルエーテルで洗浄し、大部分の混合試薬を除去した。ペプチドを3%酢酸(10ml)で抽出し、濾過により樹脂を除いた。濾液をセファデックスG-25を用いるゲル濾過により精製した。ゲル濾過の条件は、カラムサイズ2.8×60cm、検出波長230もしくは280nm; 溶媒、3%酢酸; 流速40ml/時間であった。ペプチドを含むフラクションを集めて凍結乾燥し、得られた粉末標品をさらに逆相高速液体クロマトグラフィーで精製した。カラムYMC-バック、A-324 ODS(10×250mm) 溶出溶媒A、0.1%トリフルオロ酢酸-99.9%水; 溶出溶媒B、0.1%トリフルオロ酢酸-99.9%アセトニトリル; 溶出濃度勾配プログラム、0分(90%A+10%B)、30分(60%A+40%B)(但し必要ならば他の溶出プログラムを用いる事もある。) 溶出速度1.6ml/分、検出波長230または280nm。純粋な目的物を含むピーク画分を集めてバイオラッドAGI×8(酢酸型、1.8×5cm)のカラムに通し、洗液も集めアセトニトリルを留去した後、凍結乾燥した。

【0014】このようにして得たペプチドと、そのアミノ酸分析結果ならびに逆相高速液体クロマトグラフィーにおける保持時間を表1に示す。なお、表1中のa, b, cは以下の通りである。

a: 4%チオグリコール酸存在下、6規定塩酸で減圧封管中、110℃、24時間加水分解後アミノ酸分析に付した。カッコ内は理論値。

b: 化合物名(末尾に何も付いていないのはカルボン酸タイプである):

- (1) (Leu<sup>18</sup>)hPTH(1-34)  
 (2) (Aib<sup>1</sup>)hPTH(1-34)  
 (3) (Phe<sup>11</sup>)hPTH(1-34)  
 (4) (D-Trp<sup>12</sup>)hPTH(1-34)  
 (5) (Leu<sup>8</sup>)hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (6) (D-Tyr<sup>12</sup>)hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (7) (D-Ser<sup>12</sup>)hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (8) (D-Leu<sup>12</sup>)hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (9) [3-(2-ナフチル)-D-Ala<sup>12</sup>]hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (10) (Ser<sup>11</sup>)hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (11) (Phe<sup>11</sup>, Leu<sup>18</sup>)hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (12) (Leu<sup>8</sup>, Phe<sup>11</sup>, Leu<sup>18</sup>)hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (13) (Lys<sup>11</sup>)hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (14) (Phe<sup>11</sup>)hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (15) (Arg<sup>19' 21</sup>)hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (16) [3-(2-ナフチル)-Ala<sup>11</sup>]hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>

- (17) (His<sup>26</sup>)hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (18) (His<sup>26</sup>)hPTH(1-34)  
 (19) (Gln<sup>27</sup>)hPTH(1-34)  
 (20) [Arg<sup>19' 21</sup>, 2-(1,3-ジチオラン-2-イル)-Trp<sup>23</sup>]hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>  
 (21) (Leu<sup>27</sup>)hPTH(1-34)  
 (22) (Lys<sup>11</sup>)hPTH(1-34)

c: 誘導体の高速液体クロマトグラフィーによる保持時間。分析条件: バリアン社製VISTA5000高速液体クロマトグラムとウォーターズ社712Wオートサンプラーを連結して用いた。カラム, YMC A-303 ODS (4.6×250mm); 溶出液A, 0.1%トリフルオロ酢酸-99.9%水; 溶出溶媒B, 0.1%トリフルオロ酢酸-99.9%アセトニトリル; 溶出濃度勾配プログラム, 0分(80%A+20%B), 30分(50%A+50%B); 流速0.7ml/分; 検出波長280nm。

【0015】

【表1-1】

PTH(1-34)誘導体のアミノ酸組成(a)

アミノ酸	誘導体ペプチド(b)					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Asx	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)
Ser	2.44(3)	1.57(2)	2.23(3)	2.45(3)	2.36(3)	2.48(3)
Glx	5.28(5)	5.30(5)	4.99(5)	5.22(5)	5.24(5)	5.30(5)
Gly	1.03(1)	1.02(1)	1.04(1)		1.02(1)	
Val	2.37(3)	2.77(3)	2.75(3)	2.87(3)	2.61(3)	2.79(3)
Met	0.98(1)	1.91(2)	1.91(2)	1.91(2)	0.93(1)	1.83(2)
Ile	0.92(1)	0.92(1)	0.89(1)	1.00(1)	0.88(1)	0.95(1)
Leu	6.53(6)	5.03(5)	4.07(4)	5.07(5)	6.19(6)	5.10(5)
Phe	1.01(1)	1.01(1)	2.02(2)	1.05(1)	1.03(1)	1.02(1)
Lys	3.09(3)	3.04(3)	3.03(3)	2.94(3)	3.07(3)	3.05(3)
His	2.80(3)	2.88(3)	2.86(3)	2.80(3)	2.80(3)	2.81(3)
Trp	0.90(1)	1.09(1)	1.06(1)	1.90(2)	0.96(1)	0.92(1)
Arg	2.00(2)	1.97(2)	1.98(2)	1.99(2)	2.02(2)	1.96(2)
Aib		1.04(1)				
Tyr						1.02(1)
HPLC						
保持時間						
(分)c	24.2	-	-	-	24.6	24.0

【0016】

【表1-2】

## P T H ( 1 - 3 4 ) 誘導体のアミノ酸組成 ( a )

アミノ酸	誘導体ペプチド ( b )				
	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
A s x	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)
S e r	3.39(4)	2.35(2)	2.45(3)	3.29(4)	2.07(3)
G l x	5.17(5)	5.08(5)	5.31(5)	5.14(5)	4.80(5)
G l y				1.03(1)	0.83(1)
V a l	2.83(3)	2.73(3)	2.58(3)	2.55(3)	2.43(3)
M e t	1.90(2)	1.90(2)	2.11(2)	2.10(2)	1.03(1)
I l e	0.94(1)	0.85(1)	0.90(1)	0.91(1)	0.92(1)
L e u	5.04(5)	5.97(6)	4.98(5)	3.92(4)	4.69(5)
P h e	1.05(1)	1.00(1)	1.07(1)	1.06(1)	1.70(2)
L y s	2.98(3)	2.93(3)	2.81(3)	2.81(3)	2.57(3)
H i s	2.78(3)	2.81(3)	2.67(3)	2.66(3)	2.30(3)
T r p	1.06(1)	0.86(1)	0.89(1)	0.70(1)	0.90(1)
A r g	2.01(2)	1.96(2)	1.88(2)	1.79(2)	1.61(2)
A i b					
T y r					
H P L C					
保持時間					
(分) c	21.9	26.4	28.1	20.8	27.1

【 0 0 1 7 】

【表1-3】

## P T H ( 1 - 3 4 ) 誘導体のアミノ酸組成 ( a )

アミノ酸	誘導体ペプチド ( b )					
	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)
A s x	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)
S e r	2.07(3)	1.99(2)	2.51(3)	2.55(3)	2.55(3)	2.58(3)
G l x	4.83(5)	4.71(5)	4.94(5)	3.95(4)	4.98(5)	5.05(5)
G l y	1.01(1)	0.96(1)	1.01(1)	1.02(1)	1.03(1)	1.04(1)
V a l	2.65(3)	2.63(3)	2.73(3)	1.80(2)	2.73(3)	2.75(3)
M e t		1.66(2)	2.12(2)	2.12(2)	1.90(2)	1.91(2)
I l e	0.81(1)	0.67(1)	0.84(1)	0.86(1)	0.86(1)	0.91(1)
L e u	5.97(6)	3.92(4)	4.08(4)	5.08(5)	4.07(4)	5.08(5)
P h e	1.99(2)	1.06(1)	2.04(2)	1.04(1)	1.03(1)	1.00(1)
L y s	2.92(3)	3.76(4)	2.96(3)	2.88(3)	3.03(3)	2.00(2)
H i s	2.53(3)	2.45(3)	2.69(3)	2.68(3)	3.09(3)	4.07(4)
T r p	0.65(1)	0.79(1)	0.87(1)	0.86(1)	0.92(1)	0.91(1)
A r g	1.93(2)	2.21(2)	1.94(2)	3.84(4)	1.96(2)	1.91(2)
A i b						
T y r						
H P L C						
保持時間						
(分) c	28.4	20.8	28.1	26.6	24.8	23.4

【0018】

【表1-4】

## PTH(1-34)誘導体のアミノ酸組成(a)

アミノ酸	誘導体ペプチド(b)				
	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)
A s x	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)	4.00(4)
S e r	2.58(3)	2.72(3)	2.51(3)	2.99(3)	2.49(3)
G l x	5.07(5)	6.27(6)	3.92(4)	4.90(5)	5.04(5)
G l y	1.04(1)	1.00(1)	0.99(1)	1.31(1)	1.08(1)
V a l	2.76(3)	2.76(3)	1.78(2)	2.77(3)	2.78(3)
M e t	1.91(2)	1.91(2)	2.03(2)	1.82(2)	2.12(2)
I l e	0.89(1)	0.90(1)	0.87(1)	0.91(1)	0.91(1)
L e u	5.11(5)	5.05(5)	5.04(5)	5.90(6)	3.96(4)
P h e	1.02(1)	0.96(1)	1.04(1)	1.00(1)	1.01(1)
L y s	3.02(3)	1.91(2)	2.79(3)	1.87(2)	3.86(3)
H i s	3.64(4)	2.66(3)	2.64(3)	2.79(3)	2.74(3)
T r p	0.95(1)	0.84(1)	0.84(1)	0.79(1)	0.85(1)
A r g	0.98(1)	1.86(2)	3.83(4)	1.91(2)	1.90(2)
A i b					
T y r					
H P L C					
保持時間					
(分)c	24.8	26.0	28.2	29.2	23.6

## 【0019】

【実施例2】〔Arg<sup>19'21</sup>, 2-(1,3-ジチオラン-2-イル)-Trp<sup>23</sup>〕hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>の合成と精製

〔Arg<sup>19'21</sup>〕hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>を合成したペプチド樹脂(560mg)を、p-クレゾール(620μl)、エタンジチオール(620μl)、2-メルカプトピリジン(50mg)存在下、無水フッ化水素(5ml)で、0℃、2時間処理した。フッ化水素を留去して除いた時、残留物を0.1%2-メルカプトエタノールを含んだエーテルで洗浄した。これを乾燥した後、トリフルオロ酢酸(5ml)を加えペプチドを溶解させ、樹脂をろ去した。エーテルを加え、生じた沈殿をろ取し、エーテルで洗浄した。粗精製物として280mgのペプチドが得られた。これを逆相高速液体クロマトグラフィーで精製した。カラムYMC-パック、A-324 ODS(10×250mm)；溶出溶媒A、0.1%トリフルオロ酢酸-99.9%水；溶出溶媒B、0.1%トリフルオロ酢酸-99.9%アセトニトリル；溶出濃度勾配プログラム、0分(70%A+30%B)、40分(55%A+45%B)；流速1.6ml/分。このクロマトグラフィー

で2本の大きなピーク(保持時間17.0分および18.2分)が見られた。前のピーク(保持時間17.0分)を集め、イオン交換樹脂により酢酸塩とした後凍結乾燥して〔Arg<sup>19'21</sup>〕hPTH(1-34)NH<sub>2</sub>が4.9mg得られた。この化合物は酸加水分解後のアミノ酸分析で正しいアミノ酸組成値を示し、紫外吸収曲線もトリプトファン含有ペプチドに特徴的な曲線を示した。後のピークからは6.9mgの化合物が得られたが、この化合物は酸加水分解後のアミノ酸分析値は正しい値を示したが、トリプシン消化に続くアミノペプチダーゼM消化物のアミノ酸分析でトリプトファンは0.28残基しか検出されず、グルタミン酸も理論値よりも0.65残基少なく検出された。又、紫外線吸収曲線では289nmにピークを、255nmに谷を示した。この結果、この化合物ではトリプトファン側鎖が修飾されていることが予想され、以下のようにして、それが1,3-ジチオラン基がトリプトファン側鎖インドールの2位炭素に結合したものであることを明らかにすることができた。

【0020】前記の高速液体クロマトグラフィーにより、保持時間18.2分のピークより得られた化合物(4mg

g)を60mM炭酸水素ナトリウム緩衝液pH8.0(2.6ml)に溶かし、TPCK-トリプシン(160 $\mu$ g)を加え、37℃、24時間反応した後、100℃に5分間加熱して失活させた。反応液をpH7に調整した後、アミノペプチダーゼ-M(0.5mg)を加え37℃で24時間反応させた。24時間後、更に同酵素(0.5mg)を追加し、さらに48時間後に緩衝液(10ml)と同酵素(1mg)を加え、以後70時間反応させた。反応物を逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、修飾を受けたトリプトファンを分離した。カラム、YMC D-ODS-5 S5 120A(20 $\times$ 250mm)；溶出溶媒は上記と同じ；溶出プログラム、0分(80%A+20%B)、40分(65%A+35%B)；流速、5ml/分；280nmで検出。単離された化合物は、289nmに紫外吸収の極大値を示した。又、4%チオグリコール酸含有6N塩酸による加水分解後のアミノ酸分析ではトリプトファンが検出された。この化合物を高分解能FAB-マスマスペクトル(日本電子社、AX-505W型二重収束質量分析計を用いた)に付したところ、309.0734(M+H<sup>+</sup>)のピークが観測され、これより分子式がC<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>と予想された。さらに約30 $\mu$ gを<sup>1</sup>H-NMR(日本電子社、JNM-GX400を用いた)に付した。[DMSO-d<sub>6</sub>]、 $\alpha$ -CH  $\delta$ =4.06(1H, dd like),  $\beta$ -CH<sub>2</sub> 3.54(1H, dd), 3.30(1H, dd)；1-NH 10.88(1H)；5-CH 7.50(1H, d)；6-CH 7.30(1H, t like)；7-CH 7.20(1H, t like)；8-CH 7.68(1H, d)；ジチオラン 2CH 6.14(1H, s)；ジチオラン 4CH<sub>2</sub>と5CH<sub>2</sub> 3.64(2H, m)と3.49(2H, m)。以上の結果より単離したhPTH

(1-34)NH<sub>2</sub>誘導体は23位に2-(1,3-ジチオラン-2-イル)-トリプトファンを含む化合物であることが解った。分析結果は表1に記載した。

#### 【0021】

【実施例3】 PTH部分ペプチド(1-34位)類縁体の生物活性の測定

PTH部分ペプチド(1-34位)類縁体の生物活性をシゲノラ、ザ・ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第263巻、第18369~18377頁、1980年Shigenoら〔The Journal of Biological Chemistry, 263:18369-18377(1988)〕により報告された方法を修正して評価した。96穴マルチ プレート〔ヌンクロン(Nunc)〕、ヌンク〕上で培養したマウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞株、MC3T3-E1細胞に、0.01, 0.1, 1, 10あるいは100nMの類縁体を含む、100 $\mu$ lの培養液〔20mMのN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)、0.1%牛血清アルブミン(BSA)および0.5mMのイソブチルメチルキサンチンを含む、Hank's液〕を加え、30分間室温で反応させた。0.2規定度の塩酸100 $\mu$ lを加えた後、沸騰水中に2分半浸し、PTH受容体によって産生されたサイクリック・アデノシン・1リン酸(cAMP)を細胞から抽出した。培養液中および細胞内の総cAMP測定は、市販のラジオイムノアッセイキット〔サイクリックAMP [<sup>125</sup>I]キット デュボン-第一、第一化学薬品〕を用いて行った。標準として添加したヒトPTH部分ペプチド(1-34位)の濃度に依存したcAMPの産生量の増加が常に認められた。PTH部分ペプチド(1-34位)類縁体の生物活性については表2に示した。

#### 【0022】

表2

PTH(1-34)部分ペプチドの生物活性〔hPTH(1-34)との相対活性で表わしたもの〕

hPTH(1-34)	1.00
[Leu <sup>18</sup> ] hPTH(1-34)	0.4
[Aib <sup>1</sup> ] hPTH(1-34)	1.7
[Phe <sup>11</sup> ] hPTH(1-34)	1.1
[Leu <sup>8</sup> ] hPTH(1-34)NH <sub>2</sub>	0.5
[D-Ser <sup>12</sup> ] hPTH(1-34)NH <sub>2</sub>	0.8
[D-Leu <sup>12</sup> ] hPTH(1-34)NH <sub>2</sub>	0.5
[3-(2-ナフチル)-D-Ala <sup>12</sup> ] hPTH(1-34)NH <sub>2</sub>	0.9
[Ser <sup>11</sup> ] hPTH(1-34)NH <sub>2</sub>	0.8
[Leu <sup>8</sup> , Phe <sup>11</sup> , Leu <sup>18</sup> ] hPTH(1-34)NH <sub>2</sub>	0.9
[Lys <sup>11</sup> ] hPTH(1-34)NH <sub>2</sub>	1.1
[Phe <sup>11</sup> ] hPTH(1-34)NH <sub>2</sub>	1.3
[Arg <sup>19, 21</sup> ] hPTH(1-34)NH <sub>2</sub>	0.9
[3-(2-ナフチル)-Ala <sup>11</sup> ] hPTH(1-34)NH <sub>2</sub>	1.7
[His <sup>26</sup> ] hPTH(1-34)NH <sub>2</sub>	0.9
[His <sup>26</sup> ] hPTH(1-34)	1.0
[Gln <sup>27</sup> ] hPTH(1-34)	2.5

[Arg<sup>19' 21</sup>, 2-(1,3-ジチオラン-2-イル)-Trp<sup>23</sup>] hPTH  
 (1-34)NH<sub>2</sub> 1.7  
 [Leu<sup>27</sup>] hPTH(1-34) 1.2

## 【0023】

【配列表】配列番号:1

配列の長さ:34

配列の種類:ペプチド

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His  
 20 25 30  
 Asn Phe。

## 【0024】配列番号:2

配列の長さ:34

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列の特徴:

存在位置:1

他の情報:Xaa= Ser またはAib、

存在位置:8

他の情報:Xaa= Met または脂溶性天然アミノ酸

存在位置:11

他の情報:Xaa= Leu, Ser, Lysまたは芳香族アミノ酸

存在位置:12

他の情報:Xaa= GlyまたはD-アミノ酸

存在位置:13

他の情報:Xaa= LysまたはLeu

存在位置:18

Xaa Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Xaa Xaa Xaa His Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Ser Xaa Xaa Arg Xaa Glu Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu Gln Asp Val  
 20 25 30  
 His Asn Xaa  
 34

トポロジー:直鎖状

配列の型:アミノ酸

配列の特徴:部分ペプチド

配列:

他の情報:Xaa= Met または脂溶性天然アミノ酸

存在位置:19

他の情報:Xaa= Glu または塩基性アミノ酸

存在位置:21

他の情報:Xaa= Glu または塩基性アミノ酸

存在位置:23

他の情報:Xaa= Trp または2-(1,3-ジチオラン-2-イル)  
Trp

存在位置:25

他の情報:Xaa= Arg またはHis

存在位置:26

他の情報:Xaa= Lys またはHis

存在位置:27

他の情報:Xaa= Lys, GlnまたはLeu

存在位置:34

他の情報:Xaa= PheまたはPhe-NH<sub>2</sub>

配列:

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

A61K 37/24

C07K 99:00

識別記号

AEG

庁内整理番号

8314-4C

FI

技術表示箇所